



⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift  
⑯ DE 42 44 135 A 1

⑯ Aktenzeichen: P 42 44 135.8  
⑯ Anmeldetag: 24. 12. 92  
⑯ Offenlegungstag: 8. 7. 93

⑯ Int. Cl. 5:  
**G 01 N 33/50**

G 01 N 33/543  
C 12 Q 1/04  
// (C12Q 1/04,C12R  
1:01) (C12Q 1/10,  
C12R 1:19)C07K  
15/28,17/08

DE 42 44 135 A 1

⑯ Unionspriorität: ⑯ ⑯ ⑯

03 01 92 GB 9200046

⑯ Anm. Ider:

Pall Corp., East Hills, N.Y., US

⑯ Vertr. ter

Bardehle, H., Dipl.-Ing., Pat.-Anw.; Pagenberg, J.,  
Dr. jur., Rechtsanw.; Dost, W., Dipl.-Chem.  
Drr. rnat., Altenburg, U., Dipl.-Phys., Pat.-Anwälte;  
Frohwitter, B., Dipl.-Ing., Rechtsanw.; Geißler, B.,  
Dipl.-Phys. Dr. jur., Pat.- u. Rechtsanw., 8000  
München, Kahlhofer, H., Dipl.-Phys.; Bonnekamp,  
H., Dipl.-Ing. Dipl.-Wirtsch.-Ing. Dr.-Ing., 4000  
Düsseldorf, Rost, J., Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000  
München

⑯ Erfinder:

Parke, Judith Margaret, Rowlands Castle, GB;  
Morris, Deborah Lynne, Emsworth, GB; Boulter,  
Eileen Margaret Ann, Northend, Portsmouth, GB

⑯ Verfahren und Vorrichtung für ein Partikelagglutinationstestverfahren

⑯ Ein Verfahren und eine Vorrichtung für ein Partikelagglutinationstestverfahren umfaßt das Wandern von Partikeln, die mit einem für einen Analyt spezifischen Reagenz beschichtet sind, durch ein poroses Medium. Wenn der zu detektierende Analyt in einer Probenzone des Mediums vorliegt, werden die Partikel durch eine Komplex-Bildungsreaktion immobilisiert. Ein positives Ergebnis wird angezeigt durch die Entwicklung eines optisch unterscheidbaren Bereichs in der Probenzone die durch die gebildeten Komplexe erzeugt wird.

DE 42 44 135 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Detektion eines Analyten in einer Probe auf der Grundlage einer Komplex-Bildungsreaktion innerhalb der Matrix eines Fasermediums. Die Anwesenheit oder Abwesenheit eines spezifischen Analyten wird durch die Anwesenheit oder Abwesenheit einer Reaktion vom Agglutinationstyp eines an Partikeln angelagerten Reagenzes bestimmt, die spezifisch für den zu detektierenden Analyt ist.

Analyttestverfahren auf der Grundlage von Komplex-Bildungsreaktionen, z. B., Antikörper-Antigen-Komplexbildungen, und die Immobilisierung solcher Komplexe in einem Trägermedium sind weiterentwickelt worden. Zum Beispiel, ist eine analytische Testvorrichtung in der internationalen Patentanmeldung WO 88/08 534 offenbart, bei der ein markiertes Reagenz in einer bestimmten Zone eines porösen Trägers gebunden wird, wenn der gesuchte Analyt anwesend ist.

Ein wichtiges Kriterium zur Entwicklung solcher Verfahren und Vorrichtungen ist die Porengröße und andere Eigenschaften des porösen Mediums, das verwendet werden soll, in Verbindung mit dem Typ von Fluiden oder Fluidproben, die untersucht werden sollen. Eine feinere Porengröße eines porösen Mediums wäre geeignet für die Detektion von Antigenen oder Antikörpern in Feinströmungen, wie Harn, während viskose Proben wie Serum- oder Nahrungsmittelproben, ein Medium mit einer größeren Porengröße erfordern würden.

Es wäre vorteilhaft, Testverfahren zu entwickeln, die weniger abhängig sind von der Fähigkeit des Probenfluids, durch das Medium durchzudringen. Es wäre auch vorteilhaft, ein universelles Verfahren und eine universellere Vorrichtung zu entwickeln, die zur Detektion unterschiedlicher Analyttypen, z. B. Bakterien, Viren, Antigene, Haptenen oder genetischem Material, befähigt sind.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines einfachen und schnellen Verfahrens zur Detektion eines Analyten in einer Probe. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung einer universellen Vorrichtung zur Detektion von Analyten aus einem Bereich von Proben, insbesondere viskosen, welche zuverlässig und preiswert in der Herstellung ist.

Gemäß der Erfindung werden ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Detektion eines Analyten in einer Probe bereitgestellt, wie in den Ansprüchen definiert. Das vorliegende Verfahren umfaßt das Aufbringen einer zu testenden Probe auf eine Probenzone eines porösen Mediums und das Wandern von Partikeln, die daran ein spezifisches Reagenz angelagert haben, zum zu detektierenden Analyt durch das Medium. Bei der Wanderung gehen die Partikel durch die Probenzone, und, wenn der gesuchte Analyt anwesend ist, findet eine Komplex-Bildungsreaktion des Reagenzes mit dem Analyt statt. Der Komplex wird, sofern er gebildet wird, in der Probenzone immobilisiert. Ein Bereich, der die immobilisierten Partikel enthält, wird dann in der Probenzone beobachtet. Wenn der gesuchte Analyt nicht vorliegt, werden die Partikel weiter durch die Probenzone wandern und es wird kein unterscheidbarer Bereich gebildet. Der Bereich wird dadurch unterscheidbar, daß die Komplexe entweder selbst den Bereich optisch beobachtbar machen oder durch eine nachfolgende Reaktion den Bereich optisch beobachtbar werden lassen. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Partikel mit einer Farbe versehen, so daß die aufgefangenen Komplexe, die Partikel enthalten, den Bereich beobachtbar machen.

Ein Vorteil des Verfahrens ist, daß das Probenfluid selbst nicht hoch diffusionsfähig durch das poröse Medium sein muß, es ist nur notwendig, daß die Probe in den kleinen Bereich der Probenzone durchdringt. Aus diesem Grund können viele Typen von Probenfluiden untersucht werden.

Die Wanderung der Partikel wird bevorzugt durchgeführt, indem man zuerst die Partikel auf eine zweite Zone in dem porösen Medium räumlich getrennt von der Probenzone aufbringt. Eine Waschlösung wird dann auf das Medium aufgebracht, das die Partikel von dieser zweiten Zone durch das poröse Medium trägt. Wenn die Partikel durch die Probenzone durchgehen, werden sie entweder immobilisiert aufgrund der Agglutinations- oder Komplex-Bildungsreaktion oder sie wandern durch die Probenzone weiter mit der Waschlösung, wenn kein Analyt vorliegt.

In einer Ausführungsform werden die Partikel auf das poröse Medium in der Probenzone aufgebracht, bevor man die Probe selbst aufbringt. Die Waschlösung geht dann durch die Probenzone durch und wäscht die Partikel heraus, wenn der Analyt nicht anwesend ist, oder sie nach Agglutination aufgefangen werden.

Das vorliegende Verfahren besitzt die Vorteile, schnell und einfach zu sein. Der Anwender muß einfach beobachten, ob sich ein sichtbarer Bereich entwickelt. Zum Beispiel bildet sich, wenn farbige Partikel verwendet werden, ein farbiger Bereich in der Zone, auf die Probe aufgebracht worden ist.

Die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung weist ein Gehäuse mit einem porösen Medium auf. Bei diesem Gehäuse handelt es sich bevorzugt um ein feuchtigkeitsfestes oder nicht-absorbierendes Material wie Kunststoffmaterial. Das Gehäuse weist weiter mindestens eine Öffnung auf, die eine Zone des porösen Mediums zum Aufbringen einer Probe nach außen freilegt. Das poröse Medium enthält auch Partikel, die mit einem für den zu detektierenden Analyt spezifischen Reagenz beschichtet sind. Die Partikel sind zur Wanderung durch das Medium befähigt. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Partikel in einer Partikelzone enthalten, die räumlich von der Probenzone getrennt ist. Die Partikel können jedoch auch in der Probenzone selbst vorgesehen sein. Es ist insbesondere bevorzugt, daß die Partikel eine Farbe besitzen, die sich von der Farbe des porösen Mediums abhebt.

Das Gehäuse der beanspruchten Vorrichtung weist weiter Versorgungseinrichtungen in Kommunikation mit einem Abschnitt der porösen Membran zum Aufbringen einer Waschlösung auf. Diese Versorgungseinrichtungen weisen in einer Ausführungsform eine zweite Öffnung im Gehäuse auf, die den Abschnitt des Mediums nach außen freilegt, auf den die Waschlösung aufgebracht werden kann. Vorzugsweise weisen die Versorgungseinrichtungen eine klappbare Kammer auf, die einstückig mit dem Gehäuse ausgebildet ist, das die Waschlösung enthält. Wenn eine Innenwand der Kammer umgeklappt ist, steht der Versorgungsabschnitt des porösen Mediums mit der Waschlösung in Verbindung.

# DE 42 44 135 A1

Die Vorrichtung kann einfach verpackt und im Laboratorium aufbewahrt werden. Bei Gebrauch kann sie in der Hand gehalten werden, während eine zu testende Probe, z. B., mit einer Pipette durch die Öffnung auf die Probenzone aufgebracht werden kann.

In einer weiteren Ausführungsform weist die Vorrichtung eine Vielzahl von Streifen des porösen Mediums auf, wobei jeder Streifen Partikel besitzt, die mit einem unterschiedlichen für einen unterschiedlichen Antikörper spezifischen Reagenz beschichtet sind. Auf diese Weise kann die gleiche Probe auf die Anwesenheit unterschiedlicher Analyten getestet werden, z. B. unterschiedliche Bakterien oder andere Mikroorganismen. 5

Weitere Details der Erfindung werden deutlich in der folgenden Beschreibung von Ausführungsformen unter Bezugnahme auf die Zeichnungen.

Fig. 1 ist eine schematische Zeichnung, die das Prinzip eines Verfahrens der vorliegenden Erfindung anzeigt. 10

Fig. 2 zeigt eine Ausführungsform der Vorrichtung der vorliegenden Erfindung.

Fig. 3 zeigt eine weitere Ausführungsform der Vorrichtung mit einer Vielzahl von porösen Streifen.

Die Erfindung ist weit anwendbar zur Detektion von Bakterien, Antigenen, Antikörpern, Viren oder anderen Mikroorganismen. Bei dem für den speziellen Analyt spezifischen Reagenz handelt es sich normalerweise um einen Antikörper oder ein Antigen. Geeignete monoklonale und/oder polyklonale Antikörper oder Antigene zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung sind kommerziell erhältlich. 15

Das Verfahren der vorliegenden Erfindung kann auf Grundlage der Veranschaulichung in Fig. 1 erklärt werden. Eine Probe 1, z. B. eine zu testende Bakterienprobe, wird auf eine Probenzone 2 eines porösen Mediums 10 aufgebracht. In Abhängigkeit von der Viskosität der Fluidprobe kann sie mehr oder weniger tief in das Medium 10 eindringen. Ein vollständiges Eindringen ist nicht notwendig. Wichtig ist nur, daß mindestens ein Teil des Matrixmediums in der Probenzone die Probe enthält. Die mit einem spezifischen Reagenz beschichteten Partikel 3 läßt man dann durch das Medium 10 wandern. Im Beispiel von Fig. 1 würden die Partikel in Richtung von einem ersten Ende 5 zu einem zweiten Ende 6 des Mediums 10 wandern. 20

Wenn die Partikel 3 mit dem daran angelagerten Reagenz durch die Probenzone 2 durchgehen, werden sie mit dem Analyt der Probe 1 reagieren, sofern dieser anwesend ist. Diese Komplex-Bildungsreaktion erzeugt Komplexe, die Partikel einschließen, die dann in dem porösen Medium 10 oder in der Nähe der Probenzone 2 aufgefangen werden. Hier bildet sich ein Bereich, der vom Rest des porösen Mediums unterscheidbar ist. Die Komplexe machen entweder selbst den Bereich optisch beobachtbar, z. B. indem sie die Partikel mit einem Material, das optisch aktiv ist, bereitstellen, oder sie können optisch aktiv gemacht werden, wie durch Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzreaktionen. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Partikel verwendet, die selbst eine andere Farbe als das poröse Medium besitzen. Es ist auch möglich, den Bereich optisch beobachtbar zu machen durch eine nachfolgende Reaktion der gebildeten Komplexe mit einer zusätzlichen Substanz, z. B., einem Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzmaterial oder einem Enzym, das nachfolgend zu Fluoreszenz oder Chemilumineszenz führt. 25

In der in Fig. 1 gezeigten Ausführungsform werden farbige Partikel auf eine zweite Zone 4 des porösen Mediums 10 räumlich getrennt von der Probenzone 2 aufgebracht. Die Wanderung der Partikel wird erzielt durch Aufbringen einer Waschlösung auf das poröse Medium, z. B. am ersten Ende 5 des porösen Mediums oder direkt auf die zweite Zone 4. Die farbigen Partikel werden dann mit der Waschlösung getragen, wenn sie sich entlang des Mediums in Richtung der Probenzone 2 mittels Dachtwirkung bewegen. Die farbigen Partikel werden vorzugsweise auf das poröse Medium aufgebracht, bevor die zu testende Probe aufgebracht wird. 30

In einer weiteren Ausführungsform ist es auch möglich, zuerst die farbigen Partikel in der Probenzone 2 aufzutragen und nachfolgend die darauf zu testende Probe aufzubringen. Die Waschlösung oder der Waschpuffer wird dann derart aufgebracht, um die Probenzone 2 auszuwaschen. Wie zuvor bilden sich agglutinierte Komplexe, wenn der Analyt vorliegt, und diese würden in der Probenzone zurückgehalten werden und einen sichtbaren farbigen Bereich erzeugen. Wenn der Analyt nicht vorliegt, wird die Probenzone durch die Pufferlösung ausgewaschen, wobei es zu keiner Farbentwicklung kommt und ein negatives Ergebnis angezeigt wird. 35

Farbige Partikel zweier unterschiedlicher Farben können auch auf die zweite Zone 4 aufgebracht werden. In dieser Ausführungsform kann ein für einen Analyt spezifisches Reagenz auf Perlen einer Farbe aufgebracht werden und ein zweites für einen zweiten Analyt spezifisches Reagenz kann auf Perlen einer zweiten Farbe aufgebracht werden. Nach Durchwaschen durch die Probenzone können sich unterschiedliche Situationen ergeben. Wenn nur einer der Analyten in der Probe vorliegt, werden nur die Perlen mit der zu diesem Analyt zugehörigen Farbe aufgefangen und einen beobachtbaren farbigen Bereich erzeugen. Es ist auch möglich, daß beide Analyten vorliegen, wobei in diesem Fall beide Farben der Perlen in der Probenzone aufgefangen werden würden. Wie auch in Fig. 1 gezeigt, sind Absorptionseinrichtungen 7 mit dem porösen Medium 10 an dem Ende 6 in Verbindung gebracht. In dieser Ausführungsform fördern die Absorptionseinrichtungen die Dachtwirkung der Waschlösung durch die Probenzone 2. Im allgemeinen sind die Absorptionseinrichtungen, bevorzugt ein Absorptionskissen, gegenüberliegend der Probenzone 2 von der zweiten Zone 4, die farbigen Partikel enthält, angeordnet. Auf diese Weise ergibt sich, wenn man die Waschlösung, z. B. in oder angrenzend an die zweite Zone 4 aufbringt, ein Strom der Waschlösung in Richtung der Absorptionseinrichtungen 7 und daher durch die Probenzone 2. 40

Bei der Waschlösung oder dem Waschpuffer kann es sich um eine phosphatgepufferte Kochsalzlösung, eine physiologische Kochsalzlösung oder jeden geeigneten physiologischen Puffer handeln. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ist bevorzugt. Als geeignet erwies sich auch ein Gehalt an Detergenzien, wie 0,2% Triton® X705, 0,3% Tween 20 und 0,1% Triton® X100. 45

Für die vorliegende Erfindung geeignete Partikel umfassen Latexperlen, die auch als Mikrosphären oder Mikroperlen bezeichnet werden. Perlen mit einem Durchmesser von 0,2 bis 3 µm wurden verwendet, obwohl Perlen mit einem Durchmesser von etwa 0,5 bis etwa 0,8 µm als besonders geeignet herausgefunden wurden. Die Partikel sind in verschiedenen Farben erhältlich. 50

Die Partikel oder Perlen können mit dem Reagenz auf jede geeignete Weise beschichtet werden. Das Reagenzmaterial, Proteine oder Moleküle, kann entweder an die Latexperle adsorbiert werden oder kovalent mittels chemischer Kopplung gebunden werden. Das kovalente Kopplungsverfahren ist bevorzugt. Die Perlen werden zuerst mittels Suspension in einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und zentrifugiert. Die gewaschenen Perlen werden dann in PBS und einer einen Antikörper enthaltenden Lösung von Glutaraldehyd resuspendiert und nachfolgend inkubiert.

Das poröse Medium 10 der vorliegenden Erfindung besitzt die Eigenschaft, daß die Partikel frei durch die Poren des Materials wandern können, wenn die Waschlösung aufgebracht ist. Andererseits werden, wenn der zu detektierende Analyt, z. B. ein Bakterium, in der Probe vorliegt, die agglutinierten Komplexe in der Matrix aufgefangen werden. Bei dem porösen Medium handelt es sich bevorzugt um ein hydrophiles Fasermaterial einer Polymerfaser. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Material um ein Polyolefin, vorzugsweise um Polyethylen, Polypropylen oder ein Ethylen-Niederolefin-Copolymer. LLDPE (lineares Polyethylen niedriger Dichte) ist am bevorzugtesten. Allgemein geeignete Polymere umfassen diese von Olefinen von 2 bis 10 C-Atomen. Insbesondere bevorzugt sind ein Copolymer von Ethylen und 0,5 bis 8 Gew.-% eines Comonomer, stärker bevorzugt 1 bis 7 Gew.-%. Bevorzugte Comonomere sind Olefine mit 4 bis 10 C-Atomen, stärker bevorzugt 4 bis 8 C-Atome. Am meisten bevorzugt ist ein Copolymer von Ethylen und 1-Octen.

Bei Verwendung von Polyethylen wird dieses wasserbenetzbar oder hydrophil gemacht durch Zugabe einer geeigneten Menge eines Benetzungsmittels. Die Benetzungsmittel können umfassen

- 20 a) ein alkoxyliertes Alkylphenol zusammen mit einem gemischten Mono-Di- und/oder Triglycerid oder,
- b) einen Polyoxyalkylenfettsäureester, oder,
- c) eine Kombination von (b) und eines beliebigen Teils von (a).

Solche Benetzungsmittel sind in US 45 78 414 beschrieben. Beim alkoxierten Alkylphenol handelt es sich bevorzugt um eines, bei dem die Alkylgruppe 1 bis 20 Kohlenstoffatome besitzt, stärker bevorzugt etwa 6 bis etwa 12 Kohlenstoffatome. Eine Polyethoxykette ist die bevorzugte Polyalkoxykette. Das gemischte Glycerid ist vorzugsweise ein Glycerid einer Fettsäure. Die Fettsäure kann gesättigt oder ungesättigt sein und ist vorzugsweise ein Gemisch von Fettsäuren mit einer Kohlenstoffkettenlänge im Bereich von etwa 12 bis etwa 18 Kohlenstoffatomen. Besonders bevorzugte Benetzungsmittel umfassen Atmer 645, ein komplex gemischtes Glycerid mit einem langkettigen Fettsäureaddukt, erhältlich von ICI America Inc. Ein weiteres Benetzungsmittel ist ein Monoester der Z-9-Octadecensäure und des 1,2,3-Propantriols, erhältlich von Dow Chemical als XU 61 518.10.

Die oben beschriebenen Substanzen können zur Bildung des porösen Mediums der vorliegenden Erfindung durch jedes geeignete Verfahren verarbeitet werden. Das bevorzugte hydrophile Fasermaterial kann hergestellt werden, z. B. aus Fasern, vorzugsweise aus Spinnfasern, insbesondere aus Schmelzspinnfasern. Bei der am stärksten bevorzugtesten Form des vorliegenden Materials handelt es sich um eine, die die Schmelzblasen des oben erwähnten bevorzugten Ethylenpolymers in Kombination mit einem Benetzungsmittel hergestellt wird.

Das gebildete Fasermaterial kann in Form eines Gewebes oder eines Vlieses vorliegen und kann kalandriert bzw. geglättet werden. Unkalandriertes Material wurde jedoch als am wirksamsten herausgefunden und ist bevorzugt.

Das bevorzugte hydrophile Fasermaterial gemäß der vorliegenden Erfindung hat eine oder mehrere der vorliegenden Eigenschaften in Kombination, und zwar in den folgenden weiten oder bevorzugten Bereichen:

	Eigenschaft	Weiter Bereich	Bevorzugter Bereich
45	Gehalt an Benetzungsmittel (Gew.-%) in der Polyethylenzusammensetzung	0,5 – 5,0	0,6 – 3,0, insbesondere etwa 1,0
50	Faserdurchmesser ( $\mu\text{m}$ )	1,0 – 15	2 – 11
	CWST der schmelzgeblasenen Faser (Dyn/cm)	30 – 120	100 – 120
55	Porengröße des Fasermaterials (Mikron) (ASTM F 316-80)	3 – 300	5 – 20
	Zurückgehaltenes Wasservolumen/Volumen des Materials ( $\text{cm}^3 \text{ Wasser}/\text{cm}^3 \text{ Material}$ )	0,6 – 0,95	0,7 – 0,9, insbesondere etwa 0,85
60	Materialgewicht ( $\text{g}/\text{ft}^2$ )	2 – 8	3 – 4
	Behandlung (kalandriert oder unkalandriert)	–	unkalandriert bevorzugt
	Dicke (cm)	0,01 – 0,07	0,02 – 0,06, insbesondere etwa 0,03

Die reagenzbeschichteten Partikel können auf das poröse Medium auf jede geeignete Weise aufgebracht werden. Wenn das Medium vor Gebrauch gelagert werden soll, können die Partikel in einer Saccharoselösung aufgebracht werden. Im folgenden handelt es sich um ein Beispiel eines Partikelaufbringens.

Unter Verwendung eines Camag-Dünnschichtchromatographieapplikators, oder durch manuelles Verwenden einer Pipette, wird eine 150 bis 300 mg/ml Saccharoselösung auf das Medium aufgebracht. Im vorliegenden

# DE 42 44 135 A1

Beispiel wurden etwa 2 bis 5 µl/cm 200 mg/ml Saccharoselösung als Streifen auf das poröse Medium aufgebracht. Das Medium wurde dann 1 Stunde bei 40°C wärmebehandelt.

Die Perlen werden auf den Streifen in einer 20 bis 100 mg/ml Saccharoselösung aufgebracht. Im vorliegenden Beispiel wurden die Latexperlen in 50 mg/ml Saccharoselösung unter Verwendung einer Pipette auf den Saccharosestreifen aufgebracht. Etwa 5 bis 100 µl Latexperlen/cm wurden verwendet. Das Medium ließ man dann in Luft bei Raumtemperatur trocknen.

Wie aus diesem Beispiel ersichtlich, können die Partikel auf die Oberfläche des porösen Mediums oder, wie in Fig. 1 angezeigt, über die gesamte Tiefe des Mediums aufgebracht werden. Wenn die Waschlösung angrenzend an die fixierten Perlen aufgebracht ist, können sie sogleich aus der Fixierungszone heraus und entlang des porösen Mediums wandern.

Eine Ausführungsform einer Vorrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung ist in Fig. 2 gezeigt. Die Vorrichtung weist ein Gehäuse 20 auf, bevorzugt aus einem feuchtigkeitsfesten oder nicht-absorbierenden Material. Das Gehäuse enthält das poröse Medium 10 und besitzt mindestens eine Öffnung 21, die eine Zone 2 des porösen Mediums zum Aufbringen der Analytprobe nach außen freilegt. Das poröse Medium besitzt eine Zone 4, die Partikel enthält, die mit einem für den zu detektierenden Analyt spezifischen Reagenz beschichtet sind. Wie oben erwähnt, kann die Zone 4, die Partikel enthält, wenn gewünscht, mit der Probenzone 2 zusammenfallen.

Wie vorher erwähnt, können die Partikel ein zusätzliches Material daran angelagert haben, das den Komplex nach seiner Bildung optisch sichtbar oder beobachtbar macht, und zwar entweder direkt oder durch eine nachfolgende Reaktion. Die Partikel selbst können eine Farbe besitzen, die sich von der Farbe des porösen Mediums unterscheidet, was eine visuelle Beobachtbarkeit der aufgefangenen Komplexe ermöglicht. Farbige Partikel sind die bevorzugte Form.

Es ist auch möglich, daß die Partikel in mindestens zwei unterschiedlichen Farben bereitgestellt werden. Eine Farbe der Perlen besitzt ein für einen Analyt spezifisches Reagenz und die andere Farbe der Perlen besitzt ein für einen zweiten Analyt spezifisches Reagenz. Auf diese Weise kann die Anwesenheit oder Abwesenheit zweier unterschiedlicher Analyten in einer Probe gleichzeitig getestet werden.

Das Gehäuse weist weiter Versorgungseinrichtungen in Kommunikation mit einem Abschnitt des porösen Mediums zum Aufbringen einer Waschlösung auf. Wie in der Ausführungsform in Fig. 2 gezeigt, weisen diese Versorgungseinrichtungen eine zweite Öffnung 22 im Gehäuse auf, die einen Endabschnitt 5 des porösen Mediums nach außen freilegt. Alternativ können die Versorgungseinrichtungen ein Absorptionskissen als Beschickungskissen aufweisen (nicht in Fig. 2 gezeigt). Das Pufferlösung enthaltende Beschickungskissen kann in dem Gehäuse angeordnet werden und in direktem Kontakt mit dem Ende 5 des Streifens 10 gebracht werden.

In einer weiteren Ausführungsform (nicht gezeigt) können die Versorgungseinrichtungen eine klappbare Kammer aufweisen, die Waschlösung enthält und einstückig mit dem Gehäuse 20 ausgebildet ist. Die Kammer ist ausgebildet, z. B., indem sie das erste Ende 5 des porösen Mediums umgibt. Bei äußerer Druckanwendung klappt eine Innenwand der Kammer um, was die Waschlösung in Kontakt mit dem Endabschnitt 5 des porösen Mediums treten läßt. In dieser Ausführungsform besitzt die Vorrichtung nur eine äußere Öffnung.

Das poröse Medium in der Vorrichtung von Fig. 2 ist gezeigt als ein länglicher Streifen eines Materials. Es ist auch möglich, daß die Vorrichtung mit einem kreisförmigen scheibenähnlichen Stück porösen Mediums versehen ist, das in einem kreisförmigen Gehäuse (nicht gezeigt) eingeschlossen ist. In dieser Ausführungsform ist die Öffnung 22 zum Aufbringen einer Waschlösung in der Mitte des kreisförmigen Gehäuses angeordnet, um einen zentralen Abschnitt des Fasermediums auszusetzen. Die Perlenzone 4 ist etwa um den Umfang der zentralen Öffnung 22 herum angeordnet und weist einen ringförmigen Bereich auf. Die Probenzone 2 ist dann radial weiter nach außen gerichtet von der Perlenzone 4 zu sehen. Der äußere Umfang des kreisförmigen porösen Mediums wird dann in Kontakt mit einem ringförmigen Abschnitt eines Absorptionsmaterials 7 gebracht, um eine Wanderung der Perlen radial nach außen gerichtet und durch die Probenzone zu fördern.

Wie in Fig. 2 gezeigt, ist das poröse Medium als ein länglicher Streifen mit einem ersten Ende 5 und einem zweiten Ende 6 vorgesehen. Jede geeignete Abmessung des Streifens kann verwendet werden, z. B. 1 cm mal 6 cm. Die Dicke liegt typischerweise im Bereich von 0,02 bis 0,06 cm. Die Partikelzone 4 ist angrenzend an das erste Ende 5 angeordnet, während die Probenzone in einer Zwischenposition zwischen der Partikelzone 4 und dem zweiten Ende 6 angeordnet ist. Wie auch in Fig. 2 gezeigt, sind Absorptionseinrichtungen, insbesondere ein Absorptionskissen 7, im Gehäuse in Kontakt mit dem zweiten Ende 6 des Streifens angeordnet. Der Sog des Absorptionskissens unterstützt den Strom der Perlen in Richtung durch das poröse Medium in Längsrichtung zum zweiten Ende 6. Es ist auch bevorzugt, daß das poröse Medium 10 auf einem nicht-absorbierenden Basisabschnitt 23 des Gehäuses 20 angeordnet ist.

In manchen Fällen ist es auch bevorzugt, die Vorrichtung mit einer positiven Steuer- bzw. Kontrollzone x zu versehen, die nahe oder am zweiten Ende 6 des länglichen Streifens 10 (siehe Fig. 1) angeordnet ist. Die Steuerzone überprüft, daß die Perlen 3 tatsächlich durch Wanderung durch die Probenzone 2 durchgegangen sind. Die Steuerzone x kann den gesuchten Bakterienanalyt enthalten, der zu der Komplex-Bildungsreaktion mit den Perlen führen würde, und somit zu einem positiven Ergebnis in der Zone x. Alternativ kann Glutaraldehyd in der Zone x eingebracht sein, der an mindestens einen Abschnitt der Latexperlen binden würde, wenn sie durchwandern.

Die vorliegende Vorrichtung kann auch als eine Multi-Test-Vorrichtung vorgesehen sein. Eine solche Ausführungsform ist in Fig. 3 gezeigt. Das poröse Medium ist als eine Vielzahl von länglichen Streifen vorgesehen, die von einem Gehäuse 201 umgeben sind. Die Streifen sind innerhalb des Gehäuses in einer Weise angeordnet, daß ein Fluidkontakt unter den Streifen vermieden wird. Eine gemeinsame Öffnung oder Vertiefung 221 legt ein erstes Ende 51 von jedem der länglichen Streifen zum Aufbringen einer Waschlösung frei. Die Partikelzonen 41 der Streifen enthalten farbige Partikel, wobei die Partikel jedes Streifens mit einem für einen unterschiedlichen Analyt spezifischen Reagenz beschichtet sind.

Wie in der vorhergehenden Ausführungsform ist jeder von der Vielzahl der Streifen in Kommunikation mit einem Absorptionskissen 71 angeordnet. Das Gehäuse ist auch mit Öffnungen 212 zum Freilegen der Probenzone des porösen Mediums jeden Streifens versehen. Wie in Fig. 3 gezeigt, weist die Multi-Test-Vorrichtung fünf getrennte längliche Streifen des porösen Mediums auf. Somit kann die gleiche Probe gleichzeitig auf fünf unterschiedliche Analytypen getestet werden, z. B. fünf unterschiedliche Bakterien. Auch können fünf unterschiedliche Proben gleichzeitig auf einen spezifischen Analyt getestet werden, z. B. Listeria. Die Multi-Test-Ausführungsform der vorliegenden Vorrichtung kann auch in einer kreisförmigen Anordnung (nicht gezeigt) vorgesehen sein. Das poröse Medium ist als eine kreisförmige Schicht vorgesehen, die in einem Gehäuse mit einer Öffnung oder einem Ausgang in der Mitte zum Aufbringen der Waschlösung eingeschlossen ist. Eine Vielzahl von farbige Partikel enthaltenden Partikelzonen ist in der kreisförmigen Schicht bei einer Vielzahl von Winkelpositionen bei einem ersten radialen Abstand von der Mitte angeordnet. Die Waschlösung wandert dann radial nach außen gerichtet von der Mitte durch die Partikelzonen. Radial nach außen gerichtet von jeder Partikelzone ist dann eine Probenzone bei einem zweiten radialen Abstand von der Mitte positioniert, der größer ist als der erste radiale Abstand. Öffnungen sind in dem Gehäuse angeordnet, um jede der Probenzonen freizulegen. Die Absorptionseinrichtungen in dieser kreisförmigen Ausführungsform der Vorrichtung weisen ein Absorptionsmaterial in Kontakt mit dem äußeren Umfang der kreisförmigen Schicht des porösen Mediums auf.

Die Wirkungsweise der vorliegenden Erfindung wird durch das folgende Beispiel veranschaulicht.

### Beispiel

Das Beispiel zeigt die Detektion eines Bakteriums in einer Probe, wobei das Reagenz ein für das Bakterium spezifischer Antikörper ist. Die Bakterienprobe enthielt Escherichia coli Stamm HB101. Micrococcus. Sp. wurde als das Bakterium eines Vergleichsversuches verwendet. Kaninchen-Anti-E. coli-Antikörper wurden verwendet, erhaltlich von Dako Ltd., Buckinghamshire, UK.

Der Antikörper wurde an Latexperlen von 0,55 Mikron Durchmesser angelagert, die von blauer Farbe waren. Die Perlen wurden von Polysciences Ltd, Northhampton, UK, erhalten. 1 ml Volumen der Latexperlen (2,5%ig Volumen/Gewicht) wurden in ein Eppendorf-Zentrifugenrohr gebracht. Das Rohr wurde mit einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) gefüllt, die einen pH von 7,2 besaß und 150 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> enthielt. Die Suspension von Perlen wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Perlen wurden dann zweimal gewaschen mittels Resuspendieren in PBS und abermaliges Zentrifugieren.

Die Pellets (das Pellet) von Latexperlen wurden in 1 ml 8%igem (Volumen/Volumen) Glutaraldehyd von elektronenmikroskopischem (Reinheitsgrad-)Grad in PBS resuspendiert. Die resuspendierten Latexperlen wurden dann über Nacht bei Raumtemperatur unter schonendem Röhren inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Perlen dann gewaschen mittels Resuspension in PBS und abermaliges Zentrifugieren. Die gewaschenen Latexperlen wurden in 1 ml PBS und 400 µg Antikörperlösung resuspendiert. Die Suspension wurde vier Stunden bei Raumtemperatur unter schonendem Röhren inkubiert.

Nach der Inkubation der Latexperlen mit der Antikörperlösung wurden die Perlen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets der Latexperlen wurden dann in 1 ml Rinderserumalbumin (BSA) resuspendiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Latexperlen wurden dann zentrifugiert und die Pellets der Perlen wurden in 1 ml PBS-Lösung resuspendiert. Die Pellets der Latexperlen wurden in 1 ml einer Lösung enthaltend 10 mg/ml BSA, 0,1% NaN<sub>3</sub> und 5%iges (Volumen/Volumen) Glycerol resuspendiert.

Das poröse Medium wurde als ein 1,5 cm mal 5 cm großer Streifen aus "hHDC"-Membranmaterial hergestellt, erhaltlich von Pall Corporation als P/N HHDC 4G5. Bei dem Material handelt es sich um ein hydrophiles Fasermedium auf der Grundlage eines Ethylencopolymer, wie in US 45 78 414 beschrieben. Eine Übernacht-Kultur von Escherichia coli Stamm HB101 wurde in PBS verdünnt, um eine Zellkonzentration von etwa 10<sup>6</sup> Bakterien/ml zu ergeben. 10 µl dieser Bakteriensuspension (etwa 10<sup>4</sup> Bakterien) wurden direkt auf eine Probenzone des hHDC-Streifens aufgebracht. Eine Zahl von Streifen wurde auf diese Weise hergestellt, die Teststreifen darstellen. Vergleichsstreifen wurden unter Verwendung von PBS, das keine Bakterien enthielt, oder Micrococcus enthielt, hergestellt.

Nach Beladen der hHDC-Streifen wurden 10 µl der Latexperlensuspension, die mit dem Antikörper gekoppelte Perlen enthielt, 1 cm vom Ende jedes Streifens gegenüberliegend der Stelle aufgebracht, wo die Probe aufgebracht worden war. Absorptionskissen wurden in Kontakt gebracht mit den Streifen unmittelbar hinter dem Ende, an dem die Probe beladen worden war. 200 µl PBS-Lösung wurden als die Waschlösung auf jeden Streifen angrenzend an den Punkt aufgebracht, an dem die Perlensuspension beladen worden war. Das PBS bewegte sich dann durch Dochtwirkung entlang der Streifen in Richtung der Probenzone. Die Anwesenheit oder Abwesenheit eines farbigen Bereichs, der sich nach der Perlenwanderung entwickelte, wurde aufgezeichnet.

Die mit E. coli beladenen Teststreifen reagierten mit den 0,55 µm blauen Perlen, die mit den Anti-E. coli-Antikörpern beschichtet waren, unter Erzeugung einer deutlich beobachtbaren Agglutinationszone. Ein blaufarbiges Gebiet, das sich aus der Immobilisierung der die blauen Perlen enthaltenden Komplexe ergab, war sichtbar in der und um die Zone, in der die E. coli-Probe aufgebracht worden war. Beim Testen von mit PBS oder Micrococcus beladenen Vergleichsstreifen wurde keine Agglutinationsreaktion beobachtet, d. h., es entwickelte sich kein blaues Gebiet. Beim erforderlichen Versuch entwickelte sich innerhalb ein bis drei Minuten ein unterscheidbar beobachtbar blaufarbiger Bereich. Bei den Vergleichsversuchen waren die Perlen vollständig durch die Probenzone und zum Absorptionskissen ohne Komplexbildung innerhalb ein bis drei Minuten gewandert.

Zahlreiche erforderliche Versuche zur Detektion von E. coli und Vergleichsversuche mit anderen Bakterien wurden mit keinem fehlerhaften positiven oder negativen Ergebnis durchgeführt. Alle positiven oder negativen Ergebnisse waren klar unterscheidbar als entweder positiv oder negativ. Das Testverfahren veranschaulicht, daß

das Verfahren schnell und einfach ist und in der Lage ist, verlässlich relativ kleine Mengen an Bakterien (etwa 10<sup>4</sup> E. coli) zu detektieren.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion eines Analyten, das folgende Stufen aufweist:
  - a) Aufbringen einer auf den Analyt zu testenden Probe auf eine Probenzone eines porösen Mediums,
  - b) Wandern von Partikeln, die ein für den Analyt spezifisches Reagenz daran angelagert haben, durch das Medium, wobei eine Komplex-Bildungsreaktion des Reagenzes mit dem Analyt in der Probenzone abläuft, wenn der Analyt anwesend ist, wodurch die Partikel immobilisiert werden, und
  - c) Beobachten eines Bereiches, der die in der Probenzone gebildeten Komplexe enthält, wobei die Komplexe entweder selbst den Bereich optisch beobachtbar machen oder durch eine nachfolgende Reaktion den Bereich optisch beobachtbar werden lassen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Stufe (b) des Wanderns der Partikel weiter folgende Stufen aufweist:
 

Aufbringen der Partikel auf eine zweite Zone des porösen Mediums räumlich getrennt von der Probenzone, und

Aufbringen einer Waschlösung auf das poröse Medium, um die Partikel von der zweiten Zone durch das poröse Medium zu tragen, wobei die Partikel entweder in der Probenzone immobilisiert werden, wenn der Analyt vorliegt, oder durch die Probenzone durchgehen, wenn kein Analyt vorliegt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Partikel auf das poröse Medium aufgebracht werden, bevor die zu testende Probe aufgebracht wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Stufe (b) des Wanderns der Partikel folgende Stufen aufweist:
 

Aufbringen der Partikel auf die Probenzone des porösen Mediums, bevor die Probe selbst aufgebracht wird, und

Aufbringen einer Waschlösung auf das poröse Medium derart, daß sie durch die Probenzone durchgeht, wobei die Partikel entweder in der Probenzone immobilisiert werden, wenn der Analyt vorliegt, oder aus der Probenzone ausgewaschen werden, wenn kein Analyt vorliegt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Bereich, der die Komplexe von Stufe (c) enthält, optisch beobachtbar ist, indem die Partikel mit einer Farbe versehen sind.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Partikel in zwei Farben vorgesehen sind, wobei das an die ersten farbigen Partikel angelagerte Reagenz spezifisch für einen ersten Analyt ist und das an die zweiten farbigen Partikel angelagerte Reagenz spezifisch für einen zweiten Analyt ist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Stufe des Aufbringens der Partikel auf das poröse Medium folgende Stufen aufweist:
 

Aufbringen einer Saccharoselösung auf das poröse Medium und daraufhin Trocknen des Mediums, und

Aufbringen der reagenzbeschichteten Partikel in einer Saccharoselösung auf das poröse Medium und abermaliges Trocknen des Mediums.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7, wobei das poröse Medium als ein langer Streifen vorgesehen ist und die Waschlösung aufgebracht ist, um eine Partikelwanderung entlang der Längsrichtung zu einem Ende des Streifens vorzusehen.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Stufe des Wanderns der Partikel weiter folgende Stufe aufweist:
 

Vorsehen von Absorptionseinrichtungen in Kommunikation mit dem Streifen des porösen Mediums, wobei die Absorptionseinrichtungen an dem Ende des Streifens und angrenzend an die Probenzone derart angeordnet sind, daß sie einen Strom der Waschlösung durch die Probenzone fördern.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es sich bei dem Analyt um ein Bakterium, ein Antigen, einen Antikörper oder ein Hapten handelt, insbesondere wobei es sich bei dem Analyt um ein Bakterium handelt.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Waschlösung ausgewählt ist aus phosphatgepufferter Kochsalzlösung, physiologischer Kochsalzlösung und entionisiertem Wasser.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es sich bei den Partikeln um Kunststoffperlen mit einem Durchmesser im Bereich von etwa 0,2 bis etwa 3,0 µm, insbesondere etwa 0,5 bis etwa 0,8 µm, handelt.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das poröse Medium ein hydrophiles Fasermaterial mit einer mittleren Porengröße von etwa 5 bis etwa 20 µm umfaßt.
14. Vorrichtung zur Detektion eines Analyten, mit einem Gehäuse, das ein poröses Medium enthält und mindestens eine Öffnung besitzt, die eine Probenzone des porösen Mediums zum Aufbringen einer Analytprobe nach außen freilegt, wobei das poröse Medium Partikel enthält, die ein für den zu detektierenden Analyt spezifisches Reagenz daran angelagert haben, wobei die Partikel zur Wanderung durch das poröse Medium befähigt sind.
15. Vorrichtung nach Anspruch 14, wobei die Partikel in einer Partikelzone räumlich getrennt von der Probenzone enthalten sind, oder wobei die Partikel in der Probenzone enthalten sind.
16. Vorrichtung nach Anspruch 14 oder 15, wobei die Partikel mit einer Farbe versehen sind, die sich von der Farbe des porösen Mediums unterscheidet.
17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei das Gehäuse weiter aufweist Versorgungseinrichtungen in Kommunikation mit einem Abschnitt des porösen Mediums zum Aufbringen einer Waschlösung.
18. Vorrichtung nach Anspruch 17, wobei die Versorgungseinrichtungen eine zweite Öffnung in dem

DE 42 44 135 A1

Gehäuse aufweisen, die den Abschnitt nach außen freilegt.

19. Vorrichtung nach Anspruch 17, wobei die Versorgungseinrichtungen eine klappbare Kammer aufweisen, die die Waschlösung enthält, wobei der Abschnitt des porösen Mediums mit der Kammer in Verbindung steht, wenn umgeklappt ist.

5 20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 19, wobei das poröse Medium vorgesehen ist als zumindest ein länglicher Streifen und der Abschnitt zum Aufbringen von Waschlösung an einem ersten Ende des Streifens angeordnet ist.

10 21. Vorrichtung nach Anspruch 20, wobei die Partikelzone und die Probenzone zwischen dem ersten Ende und einem zweiten Ende des zumindest einen Streifens des porösen Mediums angeordnet sind, wobei die Partikelzone näher am ersten Ende ist.

15 22. Vorrichtung nach Anspruch 21, wobei Absorptionseinrichtungen, insbesondere ein Absorptionskissen, in dem Gehäuse in Kontakt mit dem zweiten Ende des zumindest einen Streifens angeordnet sind.

23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 20 bis 22, wobei das poröse Medium eine Vielzahl von länglichen Streifen umfaßt, wobei das Gehäuse ausgebildet ist, um einen Fluidkontakt unter den Streifen zu verhindern, wobei die Partikelzonen der jeweiligen Streifen Partikel aufweisen, die für die jeweils unterschiedlichen zu detektierenden Analyten spezifische Reagenzien daran angelagert haben.

24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 19, wobei das poröse Medium als eine kreisförmige Schicht vorgesehen ist und der Abschnitt zum Aufbringen der Waschlösung in der Mitte der Schicht angeordnet ist.

20 25. Vorrichtung nach Anspruch 23, wobei eine Vielzahl von Partikelzonen, die Partikel mit für unterschiedliche Analyten spezifischen Reagenzien enthalten, in der kreisförmigen Schicht angeordnet sind bei einer Vielzahl von Winkelpositionen an einem ersten radialen Abstand von der Mitte.

26. Vorrichtung nach Anspruch 25, wobei eine Probenzone jeder der Vielzahl von Partikelzonen zugeordnet ist, wobei jede Probenzone an einem zweiten radialen Abstand von der Mitte positioniert ist, wobei der zweite radiale Abstand größer ist als der erste radiale Abstand.

27. Vorrichtung nach Anspruch 26, wobei Absorptionseinrichtungen in dem Gehäuse vorgesehen sind, wobei die Absorptionseinrichtungen in Kontakt mit dem äußeren Umfang der kreisförmigen Schicht sind.

28. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es sich bei den Partikeln um Kunststoffperlen mit einem Durchmesser im Bereich von etwa 0,2 bis etwa 3,0 µm, insbesondere etwa 0,5 bis etwa 0,8 µm, handelt.

30 29. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das poröse Medium ein hydrophiles Fasermaterial mit einer mittleren Porengröße von etwa 5 bis 20 µm und ein Volumenverhältnis von zurückgehaltenem Wasser zu Material von etwa 0,7 bis etwa 0,9 cm<sup>3</sup> Wasser/cm<sup>3</sup> Material umfaßt.

35 30. Vorrichtung nach Anspruch 29, wobei das hydrophile Fasermaterial eine Polyethylenfaser umfaßt, die ein Benetzungsmittel enthält, insbesondere wobei das Benetzungsmittel ausgewählt ist aus:

- a) einem alkoxylierten Alkylphenol zusammen mit einem gemischten Mono-, Di- und/oder Triglycerid, oder
- b) einem Polyoxyalkylenfettsäureester, oder
- c) einer Kombination von (b) und eines beliebigen Teils von (a).

40 Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

45

50

55

60

65

**- Leerseite -**

Fig. 1

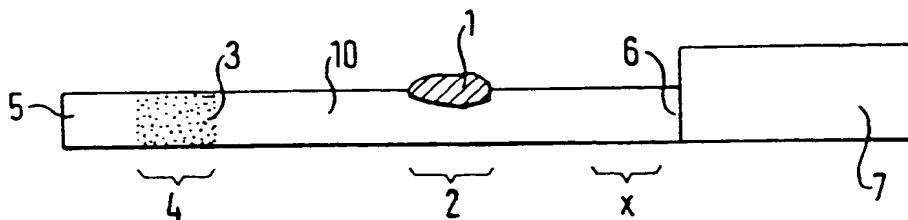


Fig. 2

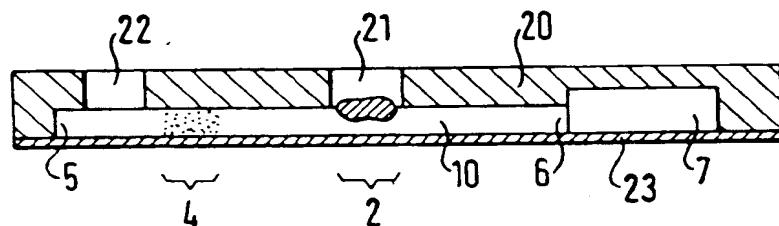


Fig. 3

